不同气味对大鼠尿液蛋白质组的影响

刘禹卿[1]，王海彤[1]，高友鹤[1]*

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

摘要：

大鼠在闻气味时，其尿液蛋白质组是否有相应的变化呢？闻不同气味产生的变化会不同吗？本研究通过对 6 只大鼠闻香油、风油精 3 天后，第 3 天、第 4 天的尿液样本进行采集，并使用 LC-MS/MS 技术对样本进行成组及单只前后对比分析。同时将已鉴定到的差异蛋白与同年龄段大鼠生长发育产生的差异蛋白进行比较，以排除生长发育对本实验结果造成的影响。实验结果表明，将香油组 Day0 和 Day4 的尿蛋白质组相比较，经过筛选可以鉴定到 143 个差异蛋白，随机产生的差异蛋白平均为 7.32 个，至少有 94.88%的差异蛋白不是随机产生的。经成组及单只前后比较分析，同一气味呈现出较为一致的变化，在香油组鉴定到了与嗅觉产生相关的低密度脂蛋白受体相关蛋白 2、COPD 的生物标志物胎球蛋白 B 等差异蛋白，同时在风油精组鉴定到子宫球蛋白、三叶草因子 3、粘蛋白 2 等变化显著且与嗅觉产生相关的差异蛋白。值得一提的是，我们在风油精组再次鉴定到了气味结合蛋白 2A，同时存在于 4 只大鼠单只前后比较产生的差异蛋白中，这与电子烟模型呈现的结果一致。本研究证明，气味会对大鼠的尿液蛋白质组产生影响，不同气味对其的影响不同。这为探究嗅觉的生物学过程提供了新方法。

关键词：尿液，蛋白质组学，气味

Effect of different odors on the rat urine proteome

Yuqing Liu[1] HaitongWang[1] Youhe Gao[1]*

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Do rats have corresponding changes in their urinary proteome when smelling odors? Do sniffing different odors produce different changes? In this study, urine samples were collected from six rats after smelling sesame oil and essential balm for three days, and on the third and fourth days, and the samples were analyzed in groups and single before and after comparisons using LC-MS/MS technology. The identified differential proteins were also compared with those produced by the growth and development of rats of the same age group to exclude the influence of growth and development on the results of this experiment. The experimental results showed that comparing the urine protein groups of Day0 and Day4 of the sesame oil group, 143 differential proteins could be identified after screening, and the average number of randomly generated differential proteins was 7.32, at least 94.88% of the differential proteins were not randomly generated. Upon comparative analysis in groups and singly before and after, the same odor showed more consistent changes, and differential proteins such as low-density lipoprotein receptor-related protein 2 and fetuin B, a biomarker of COPD, which are associated with olfactory production, were identified in the sesame oil group, while uteroglobulin, trichothecene factor 3, and visfatin 2 were identified in the essential balm group, which had significant changes and were

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）；北京师范大学（11100704）

作者简介：1.刘禹卿.（一作）（1999.12-），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；2.王海彤.（二作）（2000.04-），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。

通信联系人：高友鹤（1964.06-），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

related to the production of olfactory sensation. It is noteworthy that we identified odor-binding protein 2A again in the essential balm group, simultaneously present in the differential proteins produced by a single before-and-after comparison in four rats, which is consistent with the results presented in the e-cigarette model. This study demonstrates that odor affects the urinary proteome of rats, with different odors affecting it differently. This provides a new approach to explore the biological process of olfaction.
Keywords: Urine, Proteomics, Odor

1. 前言

1.1 尿液生物标志物

生物标志物是能够从客观的角度去反映正常的病理过程以及生理过程的指示物[1]，在临床上，生物标志物能够在不同的阶段预测、监测和诊断多因素的疾病[2]。相较于目前应用更广泛的血液生物标志物，尿液生物标志物的潜能尚未开发完全。尤其是在疾病的早期诊断和状态预测方面。由于血液中存在内环境稳态机制的调节，由疾病导致的血液蛋白质组变化被代谢排出，不能在疾病早期显现明显的变化。而尿液是由肾小球过滤血浆产生的，不受稳态机制的调节，变化灵敏，疾病在早期的微小变化都能够在尿液中观察到。且根据研究结果显示，尿液中观察到的变化远比血液早，比病理切片要早，甚至比疾病症状的显现还要早，可以应用于疾病的早期诊断。由于尿液蛋白质组易受多种因素的影响，如饮食、药物治疗、日常活动等，要使实验结果更为准确，关键是采用简单且可控制的系统。由于动物模型的遗传和环境因素可以人为控制，能够最大程度减小生长发育以外的无关因素的影响，采用动物模型是一种非常合适的实验方法。例如，(1)张繁霜等[3]研究发现，在阿尔兹海默症的转基因小鼠的脑部淀粉斑块沉积出现之前，尿中就有 29 个蛋白发生变化，而其中有 24 个蛋白被报道过与阿尔兹海默症相关或作为标志物；(2)吴建强等[4]在 Walker256 皮下瘤大鼠模型中，在皮下瘤被触及之前尿液中有 10 个蛋白发生变化；(3)Zhang Y 等[5]在慢性胰腺炎大鼠模型中，在第 2 周病理尚未出现变化前，尿液中鉴定到 15 个差异蛋白，其中有 5 个被报道过与胰腺炎有关；(4)倪艳颖等[6]在脑部注射 C6 细胞胶质瘤大鼠模型中，在影像学出现症状之前尿蛋白发生变化；(5)张繁霜等[7]在硫代乙酰胺诱导的肝纤维化大鼠模型中，在病理变化之前，尿液中鉴定到 40 个差异蛋白，有 15 个被报导过与纤维化相关；(6)Yin 等[8]发现，肥胖 2 型糖尿病大鼠血糖升高之前，尿糖水平已经呈现频繁紊乱状态，具有指示早期糖尿病的意义；(7)黄鹤等人[9]将大鼠暴露于传统香烟的烟雾中，仅在暴露两周时就筛选到了已被报道过的慢性阻塞性肺疾病(COPD)的生物标志物。经过对比研究发现，当肿瘤细胞在皮下[4]、肝脏[7]、骨[10]、肺[11]和脑部[6]不同的器官生长时，尿蛋白的变化不同，这表明尿液具有区分相同肿瘤细胞在不同器官生长的潜能。且在样本获取方面，尿液的获取更加无创、易得[12]，可见尿液是良好的生物标志物来源，且构建动物模型是尿液蛋白质组学研究中十分重要的一种手段。

目前，不同气味对大鼠尿液蛋白质组影响的研究寥寥无几。在先前的研究中，大鼠吸食茉莉花味的电子烟后，在尿液蛋白质中鉴定到了多亚型的气味结合蛋白，这说明尿液蛋白质组具有反映闻气味后机体变化的能力[13]。那么大鼠在闻不同气味后产生的变化会不同吗？这是一个十分有趣的科学问题，同样意味着。因此本文选取香油和风油精两种气味，选用 6-8 周龄 Wistar 雄性大鼠构建动物模型，致力于研究闻不同气味对大鼠尿液蛋白质组的影响（如图 1），并为探究嗅觉的生物学过程提供新方法。

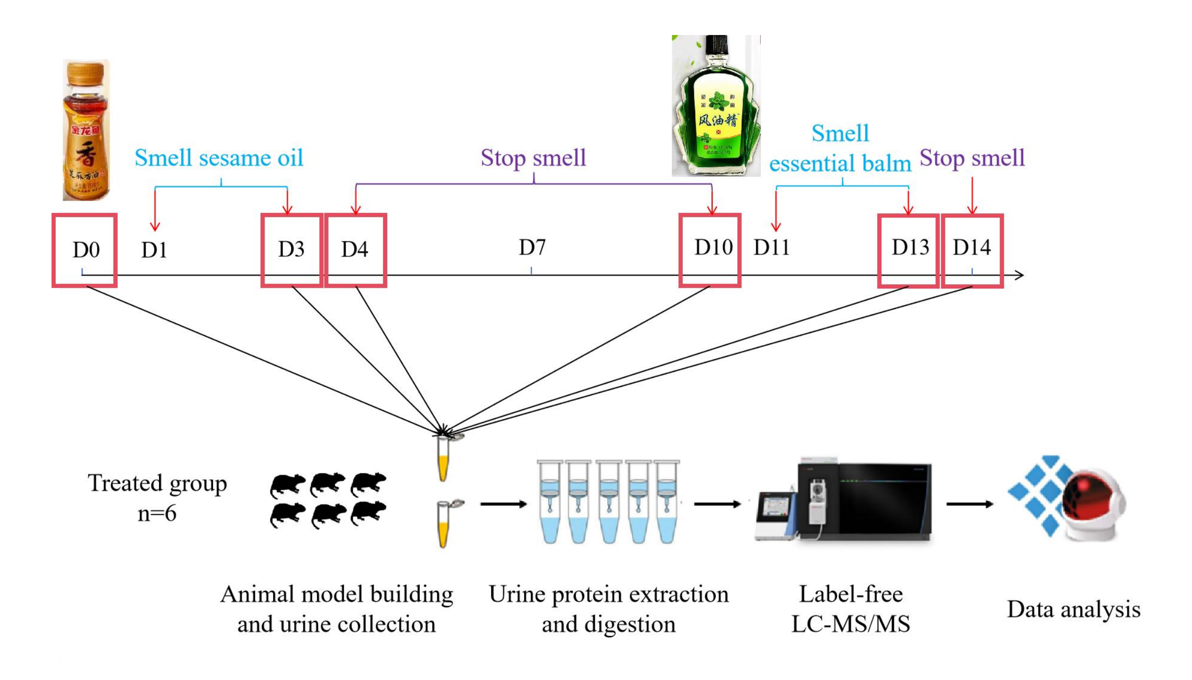


图 1 探究不同气味对大鼠尿液蛋白质组影响的技术路线

2. 材料与方法

2.1 建立动物模型

本实验选取 SPF 级 6-8 周龄健康雄性 Wistar 大鼠（180-200g）6 只，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，动物许可证号为 SYXK(京)2021-0011。所有大鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）℃，湿度 65%-70%）。将所有大鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准。

动物模型建立方法如下：6 只实验组大鼠在同一时间段闻 1 次香油，每次将 15 mL 香油放置于鼠笼【36 厘米（长）×20 厘米（宽）×28 厘米（高）】中大鼠接触不到的位置，在保证含氧量充足的条件下，每笼放入 3 只实验组大鼠，放置 1 小时，连续闻 3 天，在每次闻后将它们放回自己的笼中。在停止闻香油 1 周后，令大鼠在同一时间段闻 1 次风油精，每次将 15 mL 风油精放置于鼠笼中大鼠接触不到的位置，在保证含氧量充足的条件下，每笼放入 3 只实验组大鼠，放置 1 小时，连续闻 3 天，在每次闻后将它们放回自己的笼中。在实验过程中观察大鼠的行为变化。

2.2 尿液样品的收集

将所有大鼠在新环境中饲养三天后，统一置于代谢笼中收集 12 h 的尿液样本。在大鼠闻香油的第 3 天和停止闻香油的第 1 天（即 Day4），将全部大鼠置于代谢笼中收集 12 h 的尿液样本。风油精组收集样本方法同上。在尿液收集过程中大鼠禁食禁水，收集的尿液样本都放入−80℃冰箱保存。

2.3 尿液样品的处理

尿蛋白提取和定量：将收集到的大鼠尿液样本在 4℃的条件下 12000×g 离心 40 min，将上清液转移到新的 EP（eppendorf）管中。加入三倍体积的预冷无水乙醇，均匀混合后在-20℃条件下沉淀过夜。第二天将混合液于 4℃，12000×g 离心 30 min，弃上清。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L Tris)。于 4℃条件下 12000×g 离心 30 min，取上清置于新的 EP 管内。用 Bradford 法测量蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 μg 尿蛋白样品加入到 10 kDa 超滤管的滤膜(Pall, Port Washington, NY, USA)上，置于 EP 管中，加入 25 mmol/L NH_4HCO_3溶液使总体积为 200 μL。后加入 20 mM

二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀后，金属浴 97°C加热 5 min，冷却至室温。加入 50 mM 的碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），混匀后室温避光反应 40 min。而后进行洗膜操作：①加入 200 µL UA 溶液(8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)，按照 14000×g 5 min 18°C的条件离心洗涤两次；②上样：加入刚刚处理的样品，在 14000×g 40 min 18°C条件下进行离心；③加入 200 µL UA 溶液，18°C条件下按 14000×g 离心 40 min，重复两次；④加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液，在 14000×g 40 min 18°C条件下离心，重复两次；⑤按照胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37°C水浴过夜。第二天 13000×g 30 min 4°C条件下离心收集肽段，通过 HLB 柱(Waters，Milford，MA)除盐，使用真空干燥仪抽干，在-80°C条件下保存。

2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

将酶解后的样品溶解于 0.1%的甲酸中，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5 µg/µL。取每个样品 4 µL 制备混合多肽样，按照说明书，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液（Fractions），使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸复溶。以样品 ：iRT 为 10：1 的体积比例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。为了进行分析，每个样品取 1 µg 肽段，使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)进行质谱分析并采集数据。

为了生成谱库，将分离得到的 10 个 Fractions 在 Data Dependent Acquisition(DDA)模式下进行了质谱分析。质谱数据采用高灵敏度模式采集。在 350-1500m/z 范围内获得了一个完整的质谱扫描，分辨率设置为 60,000。单个样品采用 Data Independent Acquisition(DIA)模式进行分析。采用具有 36 个窗口的 DIA 方法进行 DIA 采集。每 8 个样品后，对汇集肽进行单次 DIA 分析作为质量控制。

2.5 数据库搜索和 Label-free DIA 定量

将从液相-质谱联用采集到的原始数据（RAW 文件），导入 Proteome Discoverer（version 2.1, Thermo Scientific），和 Swiss-Prot 大鼠数据库（发布于 2019 年 5 月，包含 8086 个序列）进行比对，并将 iRT 序列添加到大鼠数据库中。然后将搜索结果导入 Spectronaut Pulsar(Biognosys AG, Switzerland)，进行处理和分析。通过将 MS2 中各自片段离子的峰面积相加，计算出肽的丰度。蛋白质强度由各自的肽丰度相加计算蛋白质丰度。

2.6 数据分析

每个样品均进行了 3 次技术重复，取平均值用于统计学分析。本实验将不同时间段的实验组样本进行自身前后对照，同时设置对照组排除生长发育的差异。将鉴定到的蛋白进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白宽松筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾非配对 t 检验分析的 P 值＜0.05。差异蛋白严格筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥2 或≤0. 5，双尾非配对 t 检验分析的 P 值＜0.01。对筛选到的差异蛋白使用悟空平台（https://www.omicsolution.org/wkomic/main/）、Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）和 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行功能富集分析。并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索已报道文献，从而对差异蛋白进行功能分析。

3. 结果与讨论

3.1 动物模型特征

本实验对大鼠在闻香油和风油精时的行为进行观察。发现大鼠在闻香油时，十分兴奋、活泼好动，表现出明显的食用意愿。而在闻风油精时，则呈现出厌恶、躲避，缩在角落里睡觉的行为。

3.2 大鼠闻不同气味后尿液蛋白质组的鉴定

采集 6 只 6-8 周龄雄性 Wistar 大鼠 Day0、Day3、Day4、Day10、Day13、Day14 的尿液样本后，对 36 个尿液样品酶切产生的肽段进行 LC-MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 1145 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%）。

3.3 闻气味后组内前后对比尿液蛋白质变化分析

3.3.1 闻香油后组内前后对比尿液蛋白质变化分析

将大鼠闻香油后不同时间点的尿蛋白进行比较。宽松条件下，筛选差异蛋白的标准为：$FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67，双尾非配对 t 检验 $P < 0.05$。结果表明，Day0 与 Day3 相比较，可以鉴定到 52 个差异蛋白（表 S1）。将其与同周龄大鼠间隔 3 天生长发育产生的差异蛋白（表 S2，表 S3）相比较后，发现二者呈现差异蛋白重合度低，52 个差异蛋白中仅有 4 个重合的差异蛋白。证明本次鉴定到的差异蛋白由大鼠生长发育产生的可能性较小。Day0 与 Day4 相比较，可以鉴定到 143 个差异蛋白（表 S1），且包含了 Day0 与 Day3 所筛选到的全部差异蛋白（图 2）。严格条件下，筛选标准为 $FC \geq 2$ 或 ≤ 0.5，双尾非配对 t 检验 $P < 0.01$。结果表明，Day0 与 Day3 相比较，可以鉴定到 1 个差异蛋白，即 Cd99 蛋白，其 Fold change 值为 0.03，P 值为 8.80E-03。Day0 与 Day4 相比较，可以鉴定到 17 个差异蛋白（表 1）。

在鉴定到的差异蛋白中，有多个蛋白被报道与嗅觉相关。Ekström I 等人[14]在 2021 年发表的文章中表明，血清 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP）水平与衰老中的嗅觉识别能力呈负相关。而 Proft F 等人[15]研究发现肉芽肿性多血管炎(GPA)患者嗅觉减弱与 CRP 值升高显著相关。卷曲受体（Frizzled）具有七次跨膜螺旋的保守性，是一类非典型的 GPCR，Wnt/卷曲家族成员介导嗅觉感觉神经元轴突延伸[16]。Yue Y 等人[17]的研究进一步表明，Wnt 激活的嗅鞘细胞（位于嗅觉系统的特殊胶质细胞）以分泌方式刺激神经干细胞的增殖和分化。Strotmann J 等人[18]用荧光标记的重组气味结合蛋白(Odorant binding protein, OBP)装上臭味化合物，然后涂在小鼠的鼻子上，结果表明，由低密度脂蛋白受体相关蛋白 2(Low-density lipoprotein receptor-related protein 2, LRP2)介导的 OBP/臭味剂复合物进入寄生细胞的内化过程可能是快速和局部清除臭味剂的重要机制。Gajera CR 等人[19]证明，成年小鼠缺乏 LRP2 会导致室管膜下区中神经前体细胞的增殖受损，从而导致到达嗅球的神经母细胞数量减少。Diao WQ 等人的研究表明[20]，胎球蛋白 B(Fetuin-B)是与慢性阻塞性肺疾病患者肺功能严重程度相关的血浆生物标志物候选物。本研究还在宽松条件下鉴定到了载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, ApoE)（表 S1），有充分的研究表明[21][22]，ApoE 在包括嗅上皮和嗅球在内的中枢神经系统中高表达，在嗅上皮和嗅球的嗅觉信息处理中起关键作用，可以在阿尔茨海默病早期影响嗅觉系统。Struble RG 等人[23]的研究也表明 ApoE 与嗅神经发生的持续变性和再生过程有关。

表 1 Day0 vs Day4 大鼠闻香油产生的差异蛋白(FC≥2 或≤0.5, P<0.01)

Accession	Protein name	Trend	Fold change	P value
B4F7A5	Cd99 protein	↓	0.01	8.19E-03
P05544	Serine protease inhibitor A3L	↓	0.02	8.60E-03
P01048	T-kininogen 1	↓	0.02	4.96E-03
D3Z841	Butyrophilin like 10	↓	0.02	6.89E-03
P05545	Serine protease inhibitor A3K	↓	0.04	7.61E-03
P48199	C-reactive protein	↓	0.04	1.68E-03
Q9WUC4	Copper transport protein ATOX1	↓	0.04	8.10E-03
P07154	Procathepsin L	↓	0.04	6.77E-03
F1LR92	Serpin family A member 3M	↓	0.04	8.53E-03
D4A9V5	Lysyl oxidase homolog	↓	0.04	6.31E-03

Q32KJ5	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	↓	0.04	6.62E-03
Q5M7T5	Antithrombin-III	↓	0.07	8.03E-03
Q63041	Alpha-1-macroglobulin	↓	0.07	8.50E-03
P98158	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	↓	0.13	8.81E-03
P08649	Complement C4	↓	0.15	3.65E-03
Q6IRS6	Fetuin B	↓	0.26	1.92E-03
P02454	Alpha-1 type I collagen	↓	0.40	4.34E-03

将宽松条件下 Day0 与 Day3 相比鉴定到的差异蛋白进行功能分析，共富集到细胞对细胞松弛素 B 的反应、内肽酶活性的负向调节、调节去甲肾上腺素的吸收、粘连接头的蛋白质定位等 73 个生物学过程（表 S4）和细胞凋亡、吞噬细胞、癌症中的蛋白聚糖、白细胞跨内皮迁移等 31 个信号通路（表 S5）。将宽松条件下 Day0 与 Day4 相比鉴定到的差异蛋白进行功能分析，共富集到内肽酶活性的负调控、蛋白水解、细胞对细胞松弛素 B 的反应、衰老、急性期反应、去甲肾上腺素摄取的调节等 134 个生物学过程（表 S6）和癌症中的蛋白聚糖、补体和凝血级联、白细胞跨内皮迁移等 34 个信号通路（表 S7）。

3.3.2 闻风油精后组内前后对比尿液蛋白质变化分析

将大鼠闻风油精后不同时间点的尿蛋白进行比较.在宽松条件下，筛选差异蛋白的标准为：$FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67，双尾非配对 t 检验 $P < 0.05$。结果表明，Day10 与 Day13 相比较，可以鉴定到 66 个差异蛋白（表 S8）。将其与同周龄大鼠间隔 3 天生长发育产生的差异蛋白（表 S2，表 S3）相比较后，发现二者呈现差异蛋白重合度低，66 个差异蛋白中仅有 2 个差异蛋白重合。证明本次鉴定到的差异蛋白由大鼠生长发育产生的可能性较小。Day10 与 Day14 相比较，可以鉴定到 90 个差异蛋白（表 S8）。严格条件下，筛选标准为 $FC \geq 2$ 或 ≤ 0.5，双尾非配对 t 检验 $P < 0.01$。结果表明，Day10 与 Day13 相比较，可以鉴定到 14 个差异蛋白（表 2）。Day10 与 Day14 相比较，可以鉴定到 20 个差异蛋白（表 2），其中有 10 个差异蛋白与 Day10 与 Day13 相比较产生的差异蛋白重复。

在严格条件下，Day10 与 Day13 相比、Day10 与 Day14 相比（表 2），均鉴定到了粘蛋白 1(Muc1)、蛋白激酶 C 底物 80K-H、粘蛋白 19、三叶草因子 3、β-防御素 1(BD-1)等差异蛋白。在已知的 21 种粘蛋白同工酶中，人类鼻窦上皮中发现了粘蛋白 1、4、5AC 和 8，鼻窦腺体中发现了粘蛋白 1、5B 和 8[24][25][26][27]。包括 Muc1 在内的一些粘蛋白具有跨膜肽，可将其与细胞膜结合，而其他粘蛋白则完全分泌[28]，这表明粘蛋白 1 可能可以保护嗅觉神经元等极其敏感的结构[29]。Bruch RC 等人的研究表明，蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)与 G 蛋白偶联受体激酶一起，通过气味受体和可能的其他底物的磷酸化介导信号终止，参与了嗅觉信号的终止和脱敏[30][31]。Li J 等人[32]经研究发现，TFF3 通过激活 BDNF-ERK-CREB 信号逆转嗅球切除大鼠的抑郁样行为。Baines KJ 等人[33]的研究表明，β-防御素-1 蛋白升高是 COPD 和严重哮喘的一个特征，COPD 患者上皮细胞中β-防御素-1 的产生失调，证明其可能是 COPD 有效的生物标志物和潜在的治疗靶点。

在严格条件下 Day10 与 Day13 相比（表 2）及宽松条件下 Day10 与 Day14 相比（表 S8）均鉴定到了水通道蛋白-1(AQP-1)等差异蛋白。有研究表明，AQP-1 在嗅鞘神经胶质细胞、嗅觉和呼吸道粘膜的血管内皮细胞和周围的结缔组织细胞中表达[34][35]。但其表达特异性不强，与嗅觉产生的关联尚未可知。严格条件下 Day10 与 Day14 相比（表 2）及宽松条件下 Day10 与 Day13 相比（表 S8）均鉴定到了神经胶质蛋白(Gliomedin)、胰岛素样生长因子结合蛋白(Insulin-like growth factor binding protein, IGFBP)等差异蛋白。Gliomedin 是嗅觉素蛋白家族的一员，是外周神经系统 Ranvier 发育节点分子组装所必需的[36][37]。而 IGFBP-2 能够与大鼠嗅球细胞膜中的蛋白聚糖结合，同时还能够调控壳聚糖介导的人嗅觉受体神经元分化

[38][39]。在宽松条件下 Day10 与 Day14 相比（表 S8）鉴定到的原表皮生长因子(EGF)，Farbman AI 等人[40]的研究表明，EGF 可能参与了嗅上皮细胞的有丝分裂调节，而 Ohta Y 等人[41]将老年小鼠与成年小鼠在嗅上皮基底层发现表皮生长因子受体的区域数量进行比较，认为嗅上皮表皮生长因子受体的减少会抑制细胞增殖，从而导致嗅上皮萎缩。

表 2 大鼠闻风油精产生的差异蛋白(FC≥2 或≤0.5, P<0.01)

Accession	Protein name	Day10 vs Day13			Day10 vs Day14		
		Trend	Fold change	P value	Trend	Fold change	P value
B2GV31	Muc1 protein	↓	0.41	1.37E-04	↓	0.47	3.14E-04
B1WC34	Protein kinase C substrate 80K-H	↓	0.46	9.08E-05	↓	0.39	2.16E-05
M0RCH6	Charged multivesicular body protein 4B	↓	0.47	2.02E-03	↓	0.43	9.94E-04
Q9QZH0	Frizzled-4	↓	0.48	1.43E-03	↓	0.35	3.16E-04
A0A0G2JXL5	Mucin 19	↓	0.50	4.73E-03	↓	0.45	2.48E-03
G3V9J1	Murinoglobulin 2	↑	2.31	2.58E-04	↑	2.11	3.41E-03
P16636	Protein-lysine 6-oxidase	↑	2.33	8.54E-04	↑	2.93	3.34E-03
A0A0G2JSY6	Trefoil factor 3	↑	2.65	7.19E-05	↑	2.77	4.79E-05
Q99MH3	Hepcidin	↑	3.08	8.45E-03	↑	4.29	3.75E-05
O89117	Beta-defensin 1	↑	3.49	1.22E-04	↑	3.24	5.96E-03
P29975	Aquaporin-1	↓	0.37	1.24E-04	-	-	-
P17559	Uteroglobin	↓	0.38	1.60E-03	-	-	-
A0A0G2JVP4	Immunoglobulin heavy constant epsilon	↑	2.27	6.83E-03	-	-	-
A0A096MJ68	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	↑	2.82	2.25E-03	-	-	-
P07522	Pro-epidermal growth factor	-	-	-	↓	0.40	9.67E-04
Q6TMA8	Angiopoietin-related protein 4	-	-	-	↓	0.46	1.26E-03
Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	-	-	-	↓	0.47	1.42E-03
G3V8X4	Gliomedin	-	-	-	↓	0.49	6.44E-03
P46844	Biliverdin reductase A	-	-	-	↓	0.50	1.83E-04
F1LRE2	Insulin-like growth factor binding protein	-	-	-	↑	2.08	1.31E-03
P02631	Oncomodulin	-	-	-	↑	2.19	8.72E-03
D4A5L9	Similar to Cytochrome c, somatic	-	-	-	↑	2.24	4.69E-03
A0A0G2JSZ3	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1	-	-	-	↑	2.28	9.38E-06
M0R5T8	Ferritin	-	-	-	↑	2.45	7.44E-03

将宽松条件下 Day10 与 Day13 相比鉴定到的差异蛋白进行功能分析，共富集到中间丝组织、伤口愈合、对营养水平的反应等 29 个生物学过程（表 S9）和金黄色葡萄球菌感染、ECM 与受体的相互作用、TGF-β信号通路这 3 个信号通路（表 S10）。将宽松条件下 Day10 与 Day14 相比鉴定到的差异蛋白进行功能分析，共富集到细胞迁移的正向调节、对异生物刺激的反应等 133 个生物学过程（表 S11）和病灶粘连、流体剪切应力与动脉粥样硬化、癌症中的蛋白聚糖等 8 个信号通路（表 S12）。

3.4 闻气味后组间尿液蛋白质变化分析

将宽松条件下四组对比产生的差异蛋白绘制 Venn 图（图 2），结果表明香油组和风油精组共有的差异蛋白仅有 13 个（表 3），大部分差异蛋白集中在不同气味的组内。表明不同气味对大鼠尿液蛋白质组产生的影响一致性小。

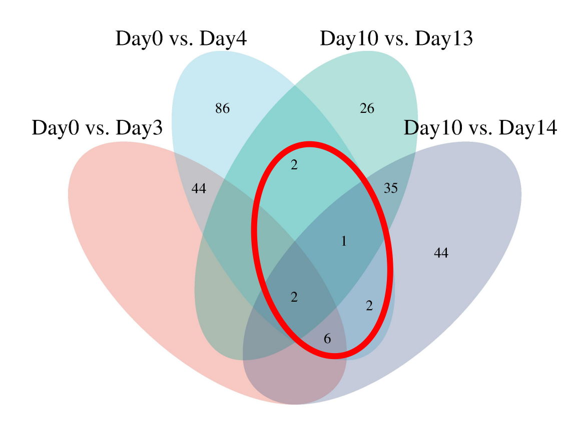


图 2 不同时间点闻香油与风油精产生的差异蛋白 Venn 图

表 3 香油组和风油精组共有的差异蛋白(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

Groups	Accession	Protein name
Day0 vs. Day3　Day0 vs. Day4　Day10 vs. Day13　Day10 vs. Day14	Q9QZH0	Frizzled-4
	Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1
Day0 vs. Day3　Day0 vs. Day4　Day10 vs. Day14	P27590	Uromodulin
	P08649	Complement C4
	O55145	Fractalkine
	P15473	Insulin-like growth factor-binding protein 3
	Q9JJ19	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1
	P07756	Carbamoyl-phosphate synthase
Day0 vs. Day4　Day10 vs. Day13　Day10 vs. Day14	P02454	Collagen alpha-1
Day0 vs. Day4　Day10 vs. Day13	P35213	14-3-3 protein beta/alpha
	A0A0G2JVN2	Secreted frizzled-related protein 4
Day0 vs. Day4　Day10 vs. Day14	Q8CHN3	WAP four-disulfide core domain protein 2
	D3ZJV7	Lipocalin 4

十分有趣的是，我们在香油组和风油精组中多次发现与丝氨酸相关的蛋白质（表 4）。有研究表明，体外丝氨酸蛋白酶抑制剂 Spi2 过表达产生了嗅觉神经元死亡的分泌信号，说明丝氨酸蛋白酶抑制剂 Spi2 可能介导嗅觉神经元凋亡[42]。而钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶 CASK 存在于嗅觉纤毛中，可能在气味传导过程中发挥作用[43]。尚未有研究报道本研究所鉴定到的丝氨酸相关蛋白与嗅觉产生之间的关系，这或许未进一步探究嗅觉产生机制提供线索。

表 4 香油组和风油精组中鉴定到与丝氨酸相关的蛋白质(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

Accession	Protein name	Group		FC	P
P05544	Serine protease inhibitor A3L	香油组	Day0 vs. Day3	0.110	0.016
			Day0 vs. Day4	0.017	0.008
P05545	Serine protease inhibitor A3K		Day0 vs. Day3	0.116	0.013
			Day0 vs. Day4	0.035	0.008
A0A0G2JSK1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3C		Day0 vs. Day3	0.096	0.041
			Day0 vs. Day4	0.004	0.025
A0A0G2K2P7	Serine/threonine-protein kinase receptor	风油精组	Day10 vs. Day13	0.662	0.008
			Day10 vs. Day14	0.518	0.002

D3ZA76	Serine protease HTRA3	Day10 vs. Day14	1.924	0.002

3.5 闻气味后单只大鼠自身前后对比尿液蛋白质变化分析

3.5.1 闻香油后单只大鼠自身前后对比尿液蛋白质变化分析

在宽松的条件下，将 6 只实验组大鼠闻香油的 Day0 与 Day3 自身前后比较产生的差异蛋白制作 Venn 图（图 3A）。结果显示，不存在 5 只共有的差异蛋白，且在同样的筛选条件下，1 号大鼠和 6 号大鼠鉴定到的差异蛋白数量呈现较大差距，表明在闻香油后，大鼠尿蛋白质组的变化具有较强的个体差异性。而 Day0 与 Day4 相比呈现的 Venn 图同样说明了这一点（图 3B）。

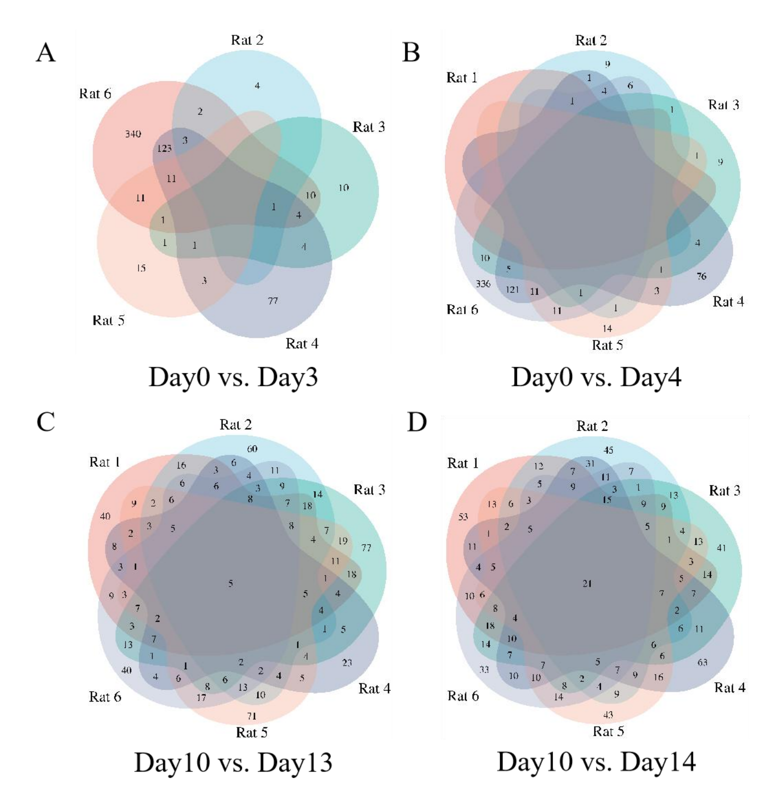


图 3 香油组和风油精组 6 只大鼠自身前后对比产生的差异蛋白 Venn 图.(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

(A) Day0 vs. Day3. (B) Day0 vs. Day4. (C) Day10 vs. Day13. (D) Day10 vs. Day14.

表 5 香油组 6 只大鼠自身前后对比 3 只及以上共同鉴定到的差异蛋白(FC≥1.5 或≤0.67, P<0.05)

Accession	Protein name	Day0 vs.Day3	Day0 vs.Day4
A0A0G2K9I6	Ceruloplasmin	Rat2 Rat3 Rat4 Rat6	Rat3 Rat4 Rat6
P15399	Probasin	Rat2 Rat4 Rat6	Rat1 Rat2 Rat4 Rat6
P02454	Collagen alpha-1	Rat2 Rat4 Rat6	Rat2 Rat4 Rat6
Z4YNX7	Cystatin-related protein 2	Rat2 Rat4 Rat6	Rat2 Rat4 Rat6
A0A0G2JTX6	C-type lectin domain containing 5A	Rat3 Rat4 Rat5	Rat3 Rat4 Rat5
Q501W2	CD27 molecule	Rat3 Rat4 Rat6	Rat3 Rat4 Rat6
M0R6C7	Mucin 2	Rat3 Rat4 Rat6	Rat3 Rat4 Rat6
Q9JI04	Alpha 4 type V collagen	Rat3 Rat4 Rat6	Rat3 Rat4 Rat6
A0A0H2UHM5	protein disulfide-isomerase	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
P07483	Fatty acid-binding protein	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
P08649	Complement C4	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6

F8WG88	Follistatin-like 1	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
P20762	Ig gamma-2C chain C region	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
F7FHF3	Serpin family F member 2	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
Q9QZQ5	CCN family member 3	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
F1M9X2	Glycoprotein 2	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
A0A0G2JSG6	Adenylate kinase 2	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6
A0A0G2K9X1	Secreted phosphoprotein 24	Rat4 Rat5 Rat6	Rat4 Rat5 Rat6

3.5.2 闻风油精后单只大鼠自身前后对比尿液蛋白质变化分析

在宽松的条件下，将 6 只实验组大鼠闻风油精的 Day10 与 Day13 自身前后比较产生的差异蛋白制作 Venn 图（图 3C）。结果显示，闻风油精后 6 只大鼠共有的差异蛋白有 18 个（表 6），而 5 只及以上大鼠共有的差异蛋白有 63 个（表 S13）。与香油组的强个体差异性相比，风油精组则整体呈现出更为一致的变化。而 Day10 与 Day14 相比呈现的 Venn 图同样说明了这一点（图 3D）。其中三叶草因子 3、铁调素、粘蛋白等差异蛋白在成组分析中同样被鉴定到（表 2、表 6）。我们还在多只大鼠中鉴定到磷脂酰肌醇蛋白聚糖(Glypican)的三种亚型(Glypican1、3、4)。其中，Saroja SR 等人[44]的研究证明 Glypican4 是 Apoe4 的结合伴侣，Apoe4 诱导的 tau 过度磷酸化是由 Glypican4 直接介导的。在香油组成组比较分析时我们鉴定到的 Apoe4 在嗅上皮和嗅球的嗅觉信息处理中起关键作用，可以在阿尔茨海默病早期影响嗅觉系统[21][22]。而 Glypican4 与嗅觉产生的关系目前尚未被报道，本研究或许为该方向的研究提供线索。

值得一提的是，在 Day10 与 Day13 组共有 4 只大鼠鉴定到气味结合蛋白 2A(Odorant binding protein 2A, OBP2A)，且有 3 只表现出下调趋势。在 Day10 与 Day14 组共有 3 只大鼠鉴定到 OBP2A，其中 2 只呈现出下调趋势。该蛋白同样在大鼠电子烟模型中被鉴定到，且该蛋白的表达变化在 6 只大鼠中呈现较强的一致性[13]。

表 6 风油精组 6 只大鼠自身前后对比 6 只及以上共同鉴定到的差异蛋白(FC≥1.5 或≤0.67, $P<0.05$)

Accession	Protein name	Day0 vs.Day3	Day0 vs.Day4
F7EZQ4	Fc fragment of IgG binding protein-like 1	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
A0A0G2JSY6	Trefoil factor 3	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
Q99MH3	Hepcidin	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
Q5M890	Apolipoprotein N	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat6
Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
Q99041	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
P97580	Beta-microseminoprotein	Rat1 Rat2 Rat3 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
D3Z9U8	S100 calcium binding protein A7 like 2	Rat1 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
P35053	Glypican-1	Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
Q642B0	Glypican 4	Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
P13265	Glypican-3	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
Q30KJ2	Beta-defensin 50	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
G3V7C6	Tubulin beta chain	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
D3ZAU0	Mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
P27590	Uromodulin	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6
Q8VD89	Ribonuclease pancreatic gamma-type	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6

A0A0G2JSZ3	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1	-	Rat1 Rat2 Rat3 Rat4 Rat5 Rat6

3.6 随机分组检验

为了确定鉴定到的差异蛋白是随机产生的可能性，对 Day0 采集的 6 个样本和 Day3 采集的 6 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），共有 462 种不同的组合情况，产生的差异蛋白平均为 9.79 个，表明至少有 81.17%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）。对 Day0 采集的 6 个样本和 Day4 采集的 6 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），产生的差异蛋白平均为 7.42 个，表明至少有 94.88%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）；以较为严格的条件（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）进行随机分组验证，产生的差异蛋白平均为 0.16 个，表明至少有 99.06%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）。对 Day10 采集的 6 个样本和 Day13 采集的 6 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），产生的差异蛋白平均为 19.91 个，表明至少有 69.83%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）；以较为严格的条件（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）进行随机分组验证，产生的差异蛋白平均为 1.41 个，表明至少有 89.93%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）。对 Day10 采集的 6 个样本和 Day14 采集的 6 个样本鉴定到的总蛋白进行随机分组验证（FC≥1.5 或≤0.67，P<0.05），产生的差异蛋白平均为 21.12 个，表明至少有 76.53%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）；以较为严格的条件（FC≥2 或≤0.5，P<0.01）进行随机分组验证，产生的差异蛋白平均为 1.49 个，表明至少有 92.55%的差异蛋白不是随机产生的（表 7）。

表 7　随机分组结果

Group	Screening criteria	Number of differential proteins	Total number of random combinations	Average numbers of proteins with false random combinations	Reliability（1-average number of protein false random combinations/number of correctly identified differential proteins）
Day0 vs. Day3	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05	52	462	9.79	81.17%
	FC≥2 或≤0.5 P<0.01	1		-	-
Day0 vs. Day4	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05	143		7.32	94.88%
	FC≥2 或≤0.5 P<0.01	17		0.16	99.06%
Day10 vs. Day13	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05	66		19.91	69.83%
	FC≥2 或≤0.5 P<0.01	14		1.41	89.93%
Day10 vs. Day14	FC≥1.5 或≤0.67 P<0.05	90		21.12	76.53%
	FC≥2 或≤0.5 P<0.01	20		1.49	92.55%

4. 结论

本研究表明，气味会对大鼠尿液蛋白质组产生的影响。且不同气味，如香油、风油精，对大鼠尿液蛋白质组产生的影响不同。这为探究嗅觉的生物学过程提供了新方法。

参考文献：

[1] Kyle Strimbu,Jorge A Tavel. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010, 5(6).

[2] Gerszten Robert E,Wang Thomas J. The search for new cardiovascular biomarkers.*Nature*. 2008, 451(7181).

[3] Zhang F, Wei J, Li X, Ma C, Gao Y. Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting Alzheimer's Disease Before Amyloid-β Plaque Deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model. *J Alzheimers Dis*. 2018, 66(2):613-637.

[4] Wu J, Guo Z, Gao Y. Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model. *Cancer Med.* 2017, 6(11):2713-2722.

[5] Zhang Y, Xie X, Zhao X, Tian F, Lv J, Ying W, Qian X. Systems analysis of singly and multiply O-glycosylated peptides in the human serum glycoproteome via EThcD and HCD mass spectrometry. *J Proteomics*. 2018, 170:14-27.

[6] Ni Y, Zhang F, An M, Yin W, Gao Y. Early candidate biomarkers found from urine of glioblastoma multiforme rat before changes in MRI. *Sci China Life Sci.* 2018, 61(8):982-987.

[7] Zhang F, Ni Y, Yuan Y, Yin W, Gao Y. Early urinary candidate biomarker discovery in a rat thioacetamide-induced liver fibrosis model. *Sci China Life Sci.* 2018, 61(11):1369-1381.

[8] Yin W, Qin W, Gao Y. Urine glucose levels are disordered before blood glucose level increase was observed in Zucker diabetic fatty rats. *Sci China Life Sci.* 2018, 61 (7):844-848.

[9] Qin W, Huang H, Dai Y, et al. Proteome analysis of urinary biomarkers in a cigarette smoke-induced COPD rat model. *Respir Res*. 2022, 23: 156.

[10] Wang T, Li L, Qin W, Gao Y. Early urine proteome changes in an implanted bone cancer rat model. *Bone Rep*. 2019, 12:100238.

[11] Wei J, Ni N, Meng W, Gao Y. Early urine proteome changes in the Walker-256 tail-vein injection rat model. *Sci Rep.* 2019, 9(1):13804.

[12] Zou Lili, Sun Wei. Human urine proteome: a powerful source for clinical research *.Adv Exp Med Biol.* 2015, 845:31-42.

[13] Liu Y, Shen Z, Gao Y, et al. Urine proteomic analysis of the rat e-cigarette model. *PeerJ*. 2023, 11:e16041.

[14] Ekström I, Vetrano DL, Laukka EJ, et al. Serum C-Reactive Protein Is Negatively Associated With Olfactory Identification Ability in Older Adults. *Iperception*. 2021, 12(2):20416695211009928.

[15] Proft F, Steinbach S, Grunke M, et al. Gustatory and olfactory function in patients with granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Scand J Rheumatol.* 2014, 43(6):512-8.

[16] Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. Wnt/Frizzled family members mediate olfactory sensory neuron axon extension. *J Comp Neurol.* 2008, 511(3):301-17.

[17] Yue Y, Xue Q, Zhang L, et al. Wnt-activated olfactory ensheathing cells stimulate neural stem cell proliferation and neuronal differentiation. *Brain Res.* 2020, 1735:146726.

[18] Strotmann J, Breer H. Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol.* 2011, 136(3):357-69.

[19] Gajera CR, Emich H, Hammes A, et al. LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *J Cell Sci.* 2010, 123(Pt 11):1922-30.

[20] Diao WQ, Shen N, He B, et al. Fetuin-B (FETUB): a Plasma Biomarker Candidate Related to the Severity of Lung Function in COPD. *Sci Rep.* 2016, 6:30045.

[21] East BS, Fleming G, Wilson DA. Human Apolipoprotein E Genotype Differentially Affects Olfactory

Behavior and Sensory Physiology in Mice. *Neuroscience*. 2018, 380:103-110.

[22] Zhang J, Hao C, Yang L, et al. The mechanisms underlying olfactory deficits in apolipoprotein E-deficient mice: focus on olfactory epithelium and olfactory bulb. *Neurobiol Aging.* 2018, 62:20-33.

[23] Struble RG, Short J, Nathan BP, et al. Apolipoprotein E immunoreactivity in human and mouse olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 1999, 267(2):137-40.

[24] Richard A. Cone. Chapter 4 - Mucus. *Mucosal immunology* (Third Edition). 2005, 49-72.

[25] Martínez-Antón A, Debolós C, Mullol J, et al. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa*. Clin Exp Allergy.* 2006, 36:448-457.

[26] Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope.* 2007, 117:932-938.

[27] Rubin BK. Mucus and mucins. *Otolaryngol Clin North Am.* 2010, 43(1):27-34, vii-viii.

[28] Hattrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol.* 2008, 70:431–457.

[29] Kennel C, Gould EA, Ramakrishnan VR, et al. Differential Expression of Mucins in Murine Olfactory Versus Respiratory Epithelium. *Chem Senses.* 2019, 44(7):511-521.

[30] Bruch RC. Phosphoinositide second messengers in olfaction. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1996, 113(3):451-9.

[31] Bruch RC, Kang J, Medler KF, et al. Protein kinase C and receptor kinase gene expression in olfactory receptor neurons. *J Neurobiol.* 1997, 33(4):387-94.

[32] Li J, Luo Y, Shi J, et al. Neuropeptide Trefoil Factor 3 Reverses Depressive-Like Behaviors by Activation of BDNF-ERK-CREB Signaling in Olfactory Bulbectomized Rats. *Int J Mol Sci.* 2015, 16(12):28386-400.

[33] Baines KJ, Wright TK, Gibson PG, et al. Airway β-Defensin-1 Protein Is Elevated in COPD and Severe Asthma. *Mediators Inflamm.* 2015, 2015:407271.

[34] Shields SD, Moore KD, Basbaum AI, et al. Olfactory ensheathing glia express aquaporin 1. *J Comp Neurol.* 2010, 518(21):4329-41.

[35] Ablimit A, Matsuzaki T, Takata K, et al. Immunolocalization of water channel aquaporins in the nasal olfactory mucosa. *Arch Histol Cytol.* 2006, 69(1):1-12.

[36] Eshed Y, Feinberg K, Peles E, et al. Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron.* 2005, 47(2):215-29.

[37] Maertens B, Hopkins D, Koch M, et al. Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation. *J Biol Chem*. 2007, 282:10647–59.

[38] Russo VC, Bach LA, Werther GA, et al. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology*. 1997, 138(11):4858-67.

[39] Huang TW, Li ST, Young TH, et al. Regulation of chitosan-mediated differentiation of human olfactory receptor neurons by insulin-like growth factor binding protein-2. *Acta Biomater.* 2019, 97:399-408.

[40] Farbman AI, Buchholz JA. Transforming growth factor-alpha and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium in vitro. *J Neurobiol.* 1996, 30(2):267-80.

[41] Ohta Y, Ichimura K. Changes in epidermal growth factor receptors in olfactory epithelium associated with aging. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000, 109(1):95-8.

[42] Thiemmara V, Pays L, Mehlen P. et al. Serine protease inhibitor Spi2 mediated apoptosis of olfactory neurons. *Cell Death Differ.* 2002, 9(12):1343-51.

[43] Saavedra MV, Smalla KH, Wyneken U. et al. Scaffolding proteins in highly purified rat olfactory cilia membranes. *Neuroreport.* 2008, 19(11):1123-6.

[44] Saroja SR, Gorbachev K, Pereira AC, et al. Astrocyte-secreted glypican-4 drives APOE4-dependent tau

hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022, 119(34): e2108870119.